



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL PROPÓLEO EN EL
CONTROL DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***

AUTOR:

PINARGOTE ANCHUNDIA EDDY GREGORIO

TUTOR:

DR. C. FERNANDO JAVIER RINCÓN ACOSTA

CALCETA, JULIO DE 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

EDDY GREGORIO PINARGOTE ANCHUNDIA con cédula de ciudadanía **1316123957** , declaro bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL PROPÓLEO EN EL CONTROL DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*** es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



EDDY PINARGOTE ANCHUNDIA

CC: 1316123957

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

EDDY GREGORIO PINARGOTE ANCHUNDIA con cédula de ciudadanía **1316123957**, autorizo a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL PROPÓLEO EN EL CONTROL DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



EDDY PINARGOTE ANCHUNDIA

CC: 1316123957

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ing. **FERNANDO JAVIER RINCÓN ACOSTA, PhD**, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL PROPÓLEO EN EL CONTROL DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***, que ha sido desarrollado por **EDDY GREGORIO PINARGOTE ANCHUNDIA**, previo a la obtención del título de **MÉDICO VETERINARIO**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

DR. FERNANDO JAVIER RINCÓN ACOSTA, PhD

CC: 0963870449

TUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes de Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL PROPÓLEO EN EL CONTROL DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***, que ha sido desarrollado por **EDDY GREGORIO PINARGOTE ANCHUNDIA**, previo a la obtención del título de **MÉDICO VETERINARIO**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Mg. LARREA IZURIETA CARLOS OCTAVIO

CC: 0603029190

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Mg. GUILLEN MENDOZA

MAURO MANABI

CC: 1305280305

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Mg. LOPEZ RAUSCHEMBERG

MARÍA KAROLINA

CC: 1308698016

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis. En primer lugar, a mi tutor de tesis, por su orientación experta, paciencia y apoyo inquebrantable a lo largo de este arduo proceso. Agradezco también a mi familia por su constante estímulo y comprensión, así mismo, quiero reconocer el invaluable aporte de mi compañero de estudio, cuyas ideas y debates enriquecieron enormemente este trabajo.

No puedo olvidar agradecer a las instituciones que facilitaron el acceso a recursos y datos necesarios para llevar a cabo esta investigación, a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron con sus conocimientos y experiencia, haciendo de este proyecto una realidad.

Y por último y no menos importante, a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano y profesional a través de una educación superior de calidad.

EDDY GREGORIO PINARGOTE ANCHUNDIA

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios por permitirme cumplir esta etapa académica, a mi familia y amigos que creyeron en mí siempre y supieron darme su apoyo, avivando mis ganas de progresar. A mi compañero de tesis, también mi gratitud a las instituciones que facilitaron el acceso a recursos necesarios principalmente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López por facilitar el uso de instalaciones y por la oportunidad otorgada para poder formar parte de ella. Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a este proyecto. Sin su colaboración, este logro no habría sido posible.

EN MEMORIA DE ELVYS ALEXANDER VÉLEZ INTRIAGO

DEDICATORIA

Este trabajo, está dedicado a mi familia, por su apoyo incondicional y por creer en mí en todo momento, a mis amigos y compañeros por su ánimo y comprensión durante este proceso. También quiero dar las gracias a mis profesores, principalmente a quien llevo la tutoría de este trabajo cuya guía y conocimientos han sido fundamentales para la realización de este. Agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a este proyecto, su colaboración ha sido invaluable.

EDDY GREGORIO PINARGOTE ANCHUNDIA

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada con amor y gratitud a mis padres, cuyo apoyo inquebrantable y sacrificios hicieron posible este logro. A mi pareja, por su constante aliento y comprensión. A mis amigos, por su incondicional amistad y por ser mi fuente de alegría en los momentos difíciles. A mi director de tesis, por su guía experta y paciencia infinita. A mis profesores, por su enseñanza y mentoría. A todas las personas que creyeron en mí y me alentaron en este camino. Esta tesis es el resultado de su apoyo y confianza.

EN MEMORIA DE ELVYS ALEXANDER VÉLEZ INTRIAGO

CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	v
AGRADECIMIENTO	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
DEDICATORIA	ix
CONTENIDO GENERAL	x
CONTENIDO DE TABLAS	xiii
CONTENIDO DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
PALABRAS CLAVE:	xiv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.4. HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. PROPÓLEO	4
2.1.1. COMPOSICIÓN	4
2.1.2. MINERALES	5
2.1.3. VITAMINAS	6
2.1.4. APLICACIÓN TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO	6
2.1.5. APLICACIONES DEL PROPÓLEO EN EL CAMPO AGROPECUARIO	6
2.2. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEOS	6
2.2.1. RASPADO DE LA COLMENA	6
2.2.2. REJILLAS O MALLAS PLÁSTICAS	7
2.3. FENOLES	7

2.4. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	7
2.5. BACTERIAS	8
2.5.1. <i>Escherichia coli</i>	8
2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO	10
3.1. UBICACIÓN	10
3.2. DURACIÓN	10
3.3. TIPO, ALCANCE Y ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN A DESARROLLAR	10
3.4. MÉTODOS Y TÉCNICAS	10
3.4.1 MÉTODOS	10
3.4.2 TÉCNICAS	11
3.5 FACTOR DE ESTUDIO	11
3.5.1. NIVELES	11
3.6 UNIDAD EXPERIMENTAL	11
3.7. VARIABLES A MEDIR	11
3.7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES	11
3.7.2. VARIABLES DEPENDIENTES	11
3.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO	12
3.8.1. RECOLECTA DEL PROPÓLEO	12
3.8.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS	12
3.8.3. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	12
3.8.4. CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES	12
3.8.5. OBTENCIÓN DE LAS BACTERIAS	13
3.8.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	13
3.8.6.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	13
3.8.6.2. TÉCNICA DE SIEMBRA Y DIFUSIÓN	13
3.8.6.3. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS EXTRACTOS DE PROPÓLEO ULTRA CONCENTRADOS.	14
3.9. DISEÑO EXPERIMENTAL	14
3.9.1. TRATAMIENTOS	14
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	14

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EL EXTRACTO DE PROPÓLEO	15
4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE ¡Error! Marcador no definido.	
4.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE ¡Error! Marcador no definido.	
4.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE ¡Error! Marcador no definido.	
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	21
5.1. CONCLUSIONES	21
5.1. RECOMENDACIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	26

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 2.1. Componentes del propóleo	5
Tabla 4.1. Contenido de fitoquímicos extractos de propóleo	15
Tabla 4.2. Actividad antimicrobiana de extractos de propóleos a diferentes concentraciones sobre <i>E. coli</i> .	16
Tabla 4.3. Actividad antimicrobiana de extractos de propóleos a diferentes concentraciones sobre <i>S. aureus</i> .	18

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 4.1. Formación de halos de inhibición del crecimiento de <i>E. Coli</i> . ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 4.2. Inhibición del crecimiento de <i>S. aureus</i> a 550 µL en comparación con el tratamiento sin aplicación de propóleo. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 4 3. Formación de halos de inhibición del crecimiento de <i>E. Coli</i> y <i>S. aureus</i> . ¡Error! Marcador no definido.	

RESUMEN

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* son dos patógenos bacterianos causantes de una gran variedad de enfermedades infecciosas en animales; para su tratamiento se aplican una gama de antibióticos sin restricciones, lo que ha conllevado al desarrollo de resistencia antimicrobiana. El objeto de estudio es evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del propóleo en el control de *E. coli* y *S. aureus*. Se aplicó el método colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu para la determinación de los compuestos polifenólicos presentes en el propóleo. La susceptibilidad de las bacterias estudiadas se midió con una regla milimetrada para la determinación del diámetro de los halos de inhibición expresados en mm. Se obtuvo un contenido de polifenoles totales de 398.79 ± 8.91 mg EAG.100 g⁻¹ propóleo y de flavonoides totales 282.20 ± 5.50 mg EQ.100 g⁻¹ propóleo. Se evidenció que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, a medida que se incrementa la concentración de los extractos de propóleo el valor del halo de inhibición fue mayor, este comportamiento se observó para ambos microorganismos. Los resultados del presente trabajo confirman la alta efectividad de los extractos de propóleo sobre las bacterias investigadas, sin embargo, se observa una mayor actividad bactericida en el control del *S. aureus* en comparación con *E. coli*. Se evidenció la excelente actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos a las diferentes concentraciones ensayadas, en el control del desarrollo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias patogénicas de gran importancia en la salud animal.

PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, extractos de propóleo, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* are two bacterial pathogens that cause a wide variety of infectious diseases in animals; a range of antibiotics are applied without restrictions for their treatment, which has led to the development of antimicrobial resistance. The purpose of the study was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of propolis in the control of *E. coli* and *S. aureus*. The colorimetric method was applied with the Folin-Ciocalteu reagent for the determination of polyphenolic compounds present in propolis. The susceptibility of the bacteria studied was measured with a millimeter ruler for the determination of the diameter of the inhibition halos expressed in mm. A total polyphenol content of 398.79 ± 8.91 mg EAG.100 g⁻¹ propolis and total flavonoids content of 282.20 ± 5.50 mg EQ.100 g⁻¹ propolis were obtained. It was evidenced that there are significant differences ($p < 0.05$) between treatments, as the concentration of propolis extracts increases the value of the inhibition halo was higher, this behavior was observed for both microorganisms. The results of the present work confirm the high effectiveness of propolis extracts on the bacteria investigated; however, a higher bactericidal activity was observed in the control of *S. aureus* in comparison with *E. coli*. The excellent antimicrobial activity of propolis extracts at the different concentrations tested was evidenced in the control of the development of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, pathogenic bacteria of great importance in animal health.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, propolis extracts, antimicrobial activity.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* son dos patógenos bacterianos causantes de una gran variedad de enfermedades infecciosas en animales, los principales mecanismos patogénicos incluyen la producción de toxinas, que puede provocar daño severo en el revestimiento intestinal, y causar diarreas agudas, y desencadenar respuestas inflamatorias a nivel de piel (Moredo y Carriquiriborde, 2019).

Se ha descrito la amplia variedad de enfermedades causadas por *E. coli* en ganado porcino y bovino, tales como: colibacilosis en terneros, Infecciones del tracto urinario (ITU), septicemia, especialmente en animales jóvenes o inmunocomprometidos (Moredo, 2019). Así mismo, *S. aureus* es la principal responsable de la mastitis bovina, lo que resulta en la disminución de la producción y de la calidad de la leche; también causa abscesos superficiales y en casos graves provoca infecciones como celulitis o foliculitis, que generan inflamación, enrojecimiento, dolor y supuración en la piel. Por otra parte, en aves de corral puede causar infecciones en las articulaciones (artritis) y los huesos (osteomielitis); en cerdos Epidermitis exudativa, causando pérdidas importantes en la producción (Stanchi, 2019).

Generalmente, para el control y tratamiento de estas enfermedades se aplica una gama de antibióticos sin restricciones, lo que ha conllevado al desarrollo de resistencia antimicrobiana a estos productos (disminución de la susceptibilidad). Por lo tanto, el uso excesivo de estos compuestos genera efectos negativos para la salud animal, y como consecuencia, repercute en la salud pública, incluso genera un impacto ambiental.

Se ha incentivado el uso de compuestos antimicrobianos alternativos para disminuir los efectos colaterales en la salud pública; el propóleo, es una sustancia presente en árboles y arbustos silvestres que las abejas extraen con el fin de construir barreras impermeables que impiden el ataque de insectos y/o el ingreso de microorganismos (Bankova *et al.* 2019); este producto natural rico en fenoles exhibe

propiedades antimicrobianas en afecciones de la piel (úlceras, abscesos, furúnculos, heridas, dermatitis y eczemas), y bucales, (antiinflamatorio y cicatrizante) (Al *et al.* 2018; Pasupuleti *et al.* 2017).

Los compuestos polifenólicos se caracterizan por poseer en su estructura molecular un grupo fenol, anillo aromático unido a un grupo hidroxilo, y son los responsables de la actividad antimicrobiana de varios productos orgánicos (Martínez *et al.*, 2023; Shixia *et al.*, 2020). Se ha descrito que los flavonoides (polifenoles) presentes en el propóleo son los principios activos que le confieren propiedades bactericidas (Rodríguez *et al.*, 2020; Pobiega *et al.*, 2019; Moncayo *et al.*, 2018; Akca *et al.*, 2016; Samara *et al.*, 2011).

Por lo anteriormente descrito, se plantea la siguiente interrogante: ¿El propóleo tendrá efecto bactericida en el control *in vitro* de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Se ha evidenciado que el propóleo tiene efecto antimicrobiano, ejerce eficaz acción sobre un grupo de bacterias y hongos patogénicos (Pobiega *et al.*, 2019; Moncayo-Luján *et al.*, 2018; Balouiri *et al.*, 2016; Samara *et al.*, 2011). Por lo tanto, estas propiedades lo convierten en una opción prometedora para el control de infecciones bacterianas tanto en animales como en humanos, lo cual surge como una alternativa válida de su uso, fundamentados en la disminución del riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana, un problema creciente en el uso de antibióticos convencionales.

Adicionalmente, el propóleo también puede proporcionar otros beneficios para el bienestar animal, promover la cicatrización de heridas, disminuir el riesgo de enfermedades bucales, actuar como antiinflamatorio, antiparasitario y anti-ulceroso (Al *et al.* 2018; Pasupuleti *et al.* 2017), y ser fuente de compuestos con actividad biológica y de antioxidantes, que potencian los beneficios para la salud fortaleciendo el sistema inmunológico (Pasupuleti *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2017; Laskar *et al.*, 2010).

Por otra parte, esta investigación tiene un impacto novedoso, debido a que la Organización Mundial de la Salud publica el listado prioritario de bacterias fármaco-resistentes de gran peligrosidad para la salud humana, entre las cuales destacan *Escherichia coli* O157:H7 productora de la toxina Shiga y *Staphylococcus aureus*, (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2024), por lo tanto, es imperativo el desarrollo de investigaciones que contribuyan a prevenir, disminuir y controlar la resistencia de estas bacterias a los antimicrobianos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del propóleo en el control de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el contenido de polifenoles totales y flavonoides totales en los extractos etanólicos de propóleo.

Valorar el grado de susceptibilidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a los extractos de propóleo a diferentes concentraciones (350 µL, 450 µL y 550 µL).

Evaluar el grado de susceptibilidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a los extractos de propóleo a las 24 h, 48 h y 72 h.

1.4. HIPÓTESIS

Los extractos de propóleo presentan excelente actividad antimicrobiana sobre las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* inhibiendo su crecimiento.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. PROPÓLEO

El propóleo es una sustancia presente en árboles y arbustos silvestres, que poseen gran cantidad de resinas, ceras, aceites esenciales y elementos insolubles que las abejas extraen con el fin de construir barreras impermeables para la colmena (tapón hermético) que impiden el ataque de insectos y el ingreso de microorganismo principalmente bacterias (Agropedia, 2022).

El mecanismo de recolección del propóleo y de su descarga dentro de la colmena, muestra la organización y disciplina en la colmena, el proceso comienza en el momento en el que la abeja encuentra el propóleo en el brote y lo desprende valiéndose de sus mandíbulas y sus patas, en tiempo de frío, la resina se encuentra más dura y la recolección se vuelve más difícil para la abeja, aquí es cuando la abeja utiliza sus glándulas mandibulares para lograr el ablandamiento del mismo (Agropedia, 2022).

Las abejas emplean el propóleo con diversos fines, principalmente lo usan para tapar las fisuras y quebraduras de la colmena, embalsamar animales muertos en el interior de la colmena, con la finalidad de aislarlo, ante la dificultad que supondría sacarlo debido a su tamaño, pegar las partes móviles de la colmena, y cubrir los panales antes de la puesta de los huevos, por parte de la reina, con vistas a una desinfección de la zona (Noriega 2014).

2.1.1. COMPOSICIÓN

Noriega (2014) indica que los análisis del propóleo muestran que contiene elementos muy interesantes, principalmente flavonoides, fenoles, algunos elementos de traza y algunos ácidos potentes, los cuales tienen gran poder restaurador en el organismo humano o el animal. Su composición es sumamente compleja:

Tabla 2.1. Componentes del propóleo

Componentes del Propóleo	Valores en %	Contenido
Resinas y bálsamos	50 – 55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Cera de abeja	30 – 40	Ácidos grasos de cadena larga
Aceites esenciales	De 5 a 10	Aceites volátiles
Polen	5	Proteínas
Materiales diversos y compuestos orgánicos	5	14 trazas de minerales, Fe y Zn (Más comunes), cetona, lactonas, quinonas, esteroides, ácido benzoico, vitaminas, azúcares

Fuente: Noriega (2014).

Por lo consiguiente, Rodríguez *et al.*, (2020) detalla lo siguiente con respecto a su composición de ácidos orgánicos:

a) Ácido benzoico y ácido gálico, ácido fenólico: ácido caseico, ácido dinámico, ácido fenilito, ácido insofenilico, ácido p cumanirico.

b) Aldehídos aromáticos: vainillina, isovainillina

c) Cumarinas: esculetol, escopoletol

Por otro lado, Flavonoides, que a su vez se dividen en:

a) Flavonas: acacetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocrisina

b) Flavonoles: galangina, izalquina, kaemperido, quercetina, ramnocitrina

c) Flavononas: pinostrovina, sakuranetina

d) Flavononoles: pinobanksina

Los flavonoides presentan múltiples funciones terapéuticas en el campo de la salud veterinaria: potenciar la actividad del ácido ascórbico (vitamina C), disminución de procesos inflamatorios, excelente propiedad antioxidante, incluso exhiben propiedades anticancerígenas (Salamanca, 2017).

2.1.2. MINERALES

Cobre y manganeso son los minerales mayoritarios presentes en el propóleo con niveles de 26.8 y 40 miligramos/kg. Adicionalmente, también se ha reportado los

elementos: aluminio, bario, bismuto, calcio, cobalto, cobre, cromo, estroncio, hierro, manganeso, magnesio, níquel plata, silicio, vanadio y zinc en menor proporción (Rodríguez *et al.*, 2020).

2.1.3. VITAMINAS

Se ha evidenciado que el propóleo contiene cantidades variables de las vitaminas A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, y se ha descartado la presencia de albúminas, ácidos nucleicos, lípidos y hormonas (Noriega, 2014).

2.1.4. APLICACIÓN TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO

Se han descritos múltiples aplicaciones terapéuticas del propóleo actúa como antiinflamatorio y bactericida en las afecciones de la piel, tales como: heridas profundas, úlceras, abscesos, furúnculos, heridas, dermatitis y eczemas; así mismo, se ha ensayado en el tratamiento de afecciones respiratorias, gastrointestinales y nutricionales con excelentes resultados e incluso para el fortalecimiento del sistema inmunológico. (Wang *et al.*, 2013).

2.1.5. APLICACIONES DEL PROPÓLEO EN EL CAMPO AGROPECUARIO

Se ha evidenciado el efecto inhibitor en el desarrollo y propagación de enfermedades transmitidas por virus a nivel agronómico, tales como necrosis del tabaco y del mosaico del pepino, disminuyendo el número de lesiones en las hojas infectadas y también inhibiendo la reproducción del virus en toda la planta. En el campo pecuario se ha demostrado su acción terapéutica en el tratamiento de fiebre aftosa, necrosis bacilar, bronconeumonía, dispepsia tóxica y paratífus (Salamanca-Grosso, 2017).

2.2. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEOS

2.2.1. RASPADO DE LA COLMENA

Es el método más sencillo, rápido y barato que emplea el apicultor para obtener mayor cantidad de propóleos, el cual consiste en raspar aleatoriamente, con la

ayuda de una espátula, las paredes internas de la colmena, con la finalidad de obtener el propóleo en forma de trozos; además de limpiar la colmena al término de la estación (Salamanca, 2017).

2.2.2. REJILLAS O MALLAS PLÁSTICAS

Son trampas comerciales que permiten obtener menor cantidad de propóleo en comparación con el método de raspado de la colmena, pero con muy pocas impurezas, por lo que se considera de mejor calidad, este método consiste en colocar láminas de plástico con ranuras (1.6 mm) en la superficie de la colmena, donde las abejas depositarán el propóleo para, posteriormente, someter la lámina a bajas temperaturas haciendo que el propóleo se vuelva duro y quebradizo, de tal manera que pueda retirarse por raspado (Noriega, 2014).

2.3. FENOLES

Las plantas producen una variedad de metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol, los cuales presentan un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático y son solubles en solventes orgánicos, de acuerdo con su diversidad química los fenoles cumplen funciones en la defensa de las plantas contra herbívoros o patógenos, otros son parte del soporte mecánico, en la atracción de polinizadores y en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras cercanas (Singleton *et al.*, 1999).

2.4. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

El reactivo de Folin- Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, el cual reacciona con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico; la transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico- fosfotúngstico en óxidos, los cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional la cantidad de grupos hidroxilos presentes a la intensidad del color azul, este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia de UV-Vis debido a que puede absorber a una longitud de 760 nm, además el contenido de fenoles totales

generalmente se expresa en equivalente de ácido gálico (Singleton *et al.*, 1999). Los disolventes más utilizados son etanol absoluto, metanol, mezclas hidroalcohólicas (etanol o metano/agua) y glicerol, el tipo de disolvente dependerá de los componentes que se pretende extraer de la muestra (Singleton *et al.*, 1999).

2.5. BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares, son microscópicas y generalmente tienen un tamaño que oscila entre 0.5 y 5 micrómetros de longitud. Pueden tener diversas formas, incluyendo esféricas (cocos), alargadas (bacilos) y en forma de espiral (espirilos o espiroquetas) (Moredo y Carriquiriborde, 2019). Adicionalmente, las bacterias son células procariotas, lo que significa que carecen de núcleo definido y de orgánulos membranosos internos. Sin embargo, tienen una estructura celular básica que incluye una membrana plasmática, citoplasma, ribosomas, material genético (ADN) circular en un área llamada nucleoide y una pared celular (Stanchi, 2019).

La composición de la pared celular comúnmente incluye peptidoglicano, un polímero de azúcares y aminoácidos que confiere resistencia a la presión osmótica y se reproducen principalmente por fisión binaria, un proceso en el que una célula bacteriana se divide en dos células hijas genéticamente idénticas, lo que permite a las bacterias crecer y multiplicarse rápidamente bajo condiciones favorables. (Moredo y Carriquiriborde, 2019)

2.5.1. *Escherichia coli*

Es una bacteria habitual en el tracto gastrointestinal de los animales y humanos, causan diarreas y diversas enfermedades intestinales; *E. coli* producen toxinas que tienen un efecto citopático irreversible sobre las células pudiendo causar la muerte (Moredo, 2019)

Las cepas verocitotoxigénicas de *E. coli* pertenecen a más de 100 serotipos diferentes, sin embargo, la cepa enterohemorrágico (EHEC) es la de mayor patogenicidad, debido a su capacidad para producir colitis hemorrágica y el síndrome de la uremia hemolítica en humanos, su habilidad para producir

verocitotoxinas, para unirse y producir lesiones de eliminación de células epiteliales y en que poseen un plásmido grande característico (Moredo, 2019).

2.5.2. *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus*, es una cepa bacteriana que se ha tornado resistente a determinados antibióticos, de interés en la medicina veterinaria, debido a la posibilidad de transmisión entre animales y humanos (Stanchi, 2019). Las infecciones SARM que por sus siglas en inglés significan *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, han sido registradas en caballos, perros, gatos, cerdos, ganado bovino, ganado ovino, conejo y pollos; la mayoría de los animales con SARM no muestran signos de la enfermedad, también se pueden evidenciar casos de neumonía o infección respiratoria, artritis o infecciones articulares, pero son menos frecuentes (Stanchi, 2019).

CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación, se llevó a cabo en los Laboratorios de Biología Molecular y Microbiología de la Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en el sitio El Limón vía al morro, situado geográficamente entre las coordenadas 0°49'35" Latitud Sur, 80°11'11" Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm.

3.2. DURACIÓN

Las actividades de investigación se desarrollaron en un lapso de 6 meses, iniciando en el mes de julio de 2023 con los estudios preliminares y finalizando el 20 de diciembre del mismo año. Posteriormente, se inició la tabulación de datos, análisis y redacción del informe final.

3.3. TIPO, ALCANCE Y ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN A DESARROLLAR

El tipo de investigación es aplicada tiene como objetivo resolver problemas prácticos o contribuir al desarrollo de soluciones concretas, por lo tanto, es de tipo experimental. El alcance es temporal indica el tiempo a desarrollar la investigación, el enfoque es mixto incluye lo cualitativo y cuantitativo.

3.4. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.4.1 MÉTODOS

Se aplicó el método experimental en la ejecución de la investigación, los métodos científicos validados y publicados específicos para la determinación de las variables de estudio.

3.4.2 TÉCNICAS

Se aplicaron las técnicas específicas para la cuantificación de polifenoles totales y flavonoides con el apoyo institucional del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Carrera Química, Facultad de Ciencias Química, Universidad Central del Ecuador. Así mismo, se aplicaron las técnicas descritas para validar la susceptibilidad de bacterias patógenas a los extractos ultraconcentrados de propóleo, en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Carrera de Medicina Veterinaria.

3.5 FACTOR DE ESTUDIO

Extractos de propóleo

3.5.1. NIVELES

Concentración 1g/10 mL a diferentes cantidades (350 µL, 450 µL y 550 µL)

3.6 UNIDAD EXPERIMENTAL

La Unidad experimental la constituyó 1 placa de petri, 12 para la siembra de *Escherichia coli* y 12 para *Staphylococcus aureus*, para un total de 24 unidades experimentales.

3.7. VARIABLES A MEDIR

3.7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Extractos de propóleo 350 µL, 450 µL y 550 µL

3.7.2. VARIABLES DEPENDIENTES

La susceptibilidad de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.8.1. RECOLECTA DEL PROPÓLEO

El Propóleo se obtuvo de granjas apícolas localizadas en el Cantón Chone, Provincia de Manabí, y se procedió enviar al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Carrera Química, Facultad de Ciencias Química, Universidad Central del Ecuador, para su procesamiento y caracterización química.

3.8.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

El propóleo se trituró hasta obtener un polvo muy fino en una licuadora industrial (Osterizer® MAX Reversible modelo Oster® BLST4655, motor de 1.500 W, Ecuador) a 30.000 rpm/ 5 min, y se mezclaron 10 g de propóleo en 100 ml de etanol al 70 % y se agitaron a 37 °C durante 24 h. Luego, se centrifugó a 26.000 × g durante 30 min y se filtró con papel Whatman No. 4. Se utilizó un evaporador rotatorio a 50 °C con baja presión para evaporar el resto del etanol. La muestra se mantuvo a 4 °C en recipientes ámbar hasta su uso. Los sobrenadantes obtenidos se usaron para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

3.8.3. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

Se aplicó el método de Singleton *et al* (1999), el cual se fundamenta en el método colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu. Se mezclará 100 µL del extracto etanólico de propóleo con 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y 400 µL de carbonato de sodio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 7,5% (m/v). La absorbancia se midió a 765 nm, previa incubación por 10 min en un baño a 37°C; Se realizó una curva de calibración (0; 0,25; 0,05 y 0,1 g·L⁻¹) con ácido gálico (Sigma, Steinheim, Germany) partiendo de una solución madre de 0,1 g·L⁻¹. Los resultados obtenidos se expresaron como mg de ácido gálico (mg AG 100 g⁻¹ propóleo).

3.8.4. CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES

Se empleó el método de Woisky y Salatino (1998). La concentración de flavonoides se determinó a través de una curva de calibración (0; 0,25; 0,05; 0,1, 0,2; 0,3; 0,4;

0,5; 0,7 y 0,8 g·L⁻¹) con quercetina (Sigma, Germany). Los resultados se expresaron como mg Q 100 g⁻¹ de propóleo.

3.8.5. OBTENCIÓN DE LAS BACTERIAS

Los cultivos puros certificados de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fueron donados por el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López-ESPAM-MFL.

3.8.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

3.8.6.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se empleó la técnica de difusión de sustancias en agar, descrita por Laurencio-Silva *et al* (2017), se usaron *E. coli* y *S. aureus* como cepas indicadoras las cuales se inocularon en caldo nutriente (DIFCO™), y se incubaron en zaranda termostática durante 18 h a 37 °C, para su activación. Posteriormente, se prepararon 24 tubos de ensayos 20 mL con medio de cultivo el BBL-Muller Hinton II agar los que fueron vertidos en placas para su solidificación.

3.8.6.2. TÉCNICA DE SIEMBRA Y DIFUSIÓN

Se añadió 200 µL de caldo de cultivo que contenía las cepas de las bacterias objeto de estudios activas en las placas solidificadas, procediéndose a la inoculación (siembra y difusión de *E. coli* y *S. aureus*), las placas se mantuvieron a 5 °C por 30 min h, para una mejor difusión de los microorganismos en el agar. Posteriormente, se abrieron pocillos de 5 mm de diámetro, y en ellos se depositaron 350 µL, 450 µL y 550 µL de los extractos de propóleo ultraconcentrados, Luego se incubaron a 35 °C, en condiciones de anaerobiosis entre 24 y 48 h, hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición.

3.8.6.3. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS EXTRACTOS DE PROPÓLEO ULTRACONCENTRADOS.

La determinación de la susceptibilidad de las cepas estudiadas se realizó con una regla de medición de halo de inhibición bacteriano; el valor resultante se expresó en milímetros (mm) (Bauer *et al.*, 1966). El método describe la tabla de clasificación del grado de susceptibilidad del microorganismo según las mediciones expresadas en mm del halo. Estableciendo los siguientes rangos ≤ 15 (resistente) 16-20 (intermedia) ≥ 21 (susceptible).

3.9. DISEÑO EXPERIMENTAL

No se aplicó un diseño experimental clásico por la naturaleza no paramétrica de los resultados.

3.9.1. TRATAMIENTOS

Se evaluaron 6 tratamientos que consideraron la interacción entre el tipo de bacteria y el nivel de concentración de propóleo (350 μL , 450 μL y 550 μL), con 4 repeticiones por concentración para un total de 12 unidades experimentales por bacteria estudiada.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El contenido de fenoles las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos, aplicando el método específico para determinar fitoquímicos, fueron tabulados en hoja de cálculo Excel y se aplicó estadística descriptiva, los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. En cuanto a la actividad antimicrobiana y prueba de sensibilidad de los extractos de propóleo, se aplicó un análisis de la varianza no paramétrico (Kruskall-Wallis), mediante el programa estadístico InfoStat, debido a que los resultados no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EL EXTRACTO DE PROPÓLEO

Los resultados obtenidos del contenido de fitoquímicos (polifenoles totales, flavonoides totales) en el extracto de propóleo, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 4.1. Contenido de fitoquímicos extractos de propóleo

Fitoquímicos	Contenido
Polifenoles totales, mg EAG.100 g ⁻¹	398.79 ± 8.91
Flavonoides totales , mg EQ.100 g ⁻¹	282.20 ± 5.50

Nota: Los resultados se presentan como medias ± desviación estándar (n= 3)

Los polifenoles totales obtenidos en el presente estudio (398.79 ± 8.91 mg EAG.100 g⁻¹ propóleo) se encuentra dentro del rango reportado para propóleos localizados en diferentes regiones del mundo (68.8 a 500.9 mg EAG.100 g⁻¹ propóleo) (Pobiega *et al.*, 2019; Hernández-Zarate *et al.*, 2017; Isidorov *et al.*, 2014; Lagouri *et al.*, 2013).

Por otra parte, el contenido de flavonoides (282.20 ± 5.50 mg EQ.100 g⁻¹ propóleo), es mayor a los reportados en diferentes localidades tales como: USA, Brasil, Tailandia y Nueva Zelanda en promedio (200 mg EQ.100 g⁻¹ propóleo) (Laskar *et al.*, 2010), y a la variación de 8.3 a 188.0 mg EQ.100 g⁻¹ propóleo observadas en diferentes áreas de China, la India, Macedonia e Irán (Lagouri *et al.*, 2013), pero menor a los valores reportados por Hernández-Zarate *et al.* (2017) en Guanajuato, México: 379.2 mg EQ por g⁻¹ propóleo.

La variación del contenido de estos biocompuestos se atribuye al tipo de plantas localizadas en la región donde las abejas colectan las gomas y/o resinas, época del año y al método de extracción empleado (Pobiega *et al.*, 2019; Belwal *et al.*, 2018; Hernández-Zarate *et al.*, 2017; Samara *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos, presentan actividad biológica que potencian su poder antioxidante, contribuyendo a disminuir los riesgos de padecimiento de enfermedades degenerativas tales como: hipertensión, cáncer, diabetes,

enfermedades cerebrovasculares y envejecimiento celular (McDougall, 2016; Chan *et al.*, 2016). Así mismo, se les ha atribuido a estos metabolitos secundarios actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2020; Luján *et al.*, 2018; Vargas-Sánchez *et al.*, 2014a).

4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE *Escherichia coli*

La Tabla 4.2, muestra la susceptibilidad de *E. coli* a diferentes concentraciones de extractos de propóleo, lo cual se determinó aplicando el método de Bauer *et al* (1966), cuyos resultados indican el diámetro del halo formado expresados en mm.

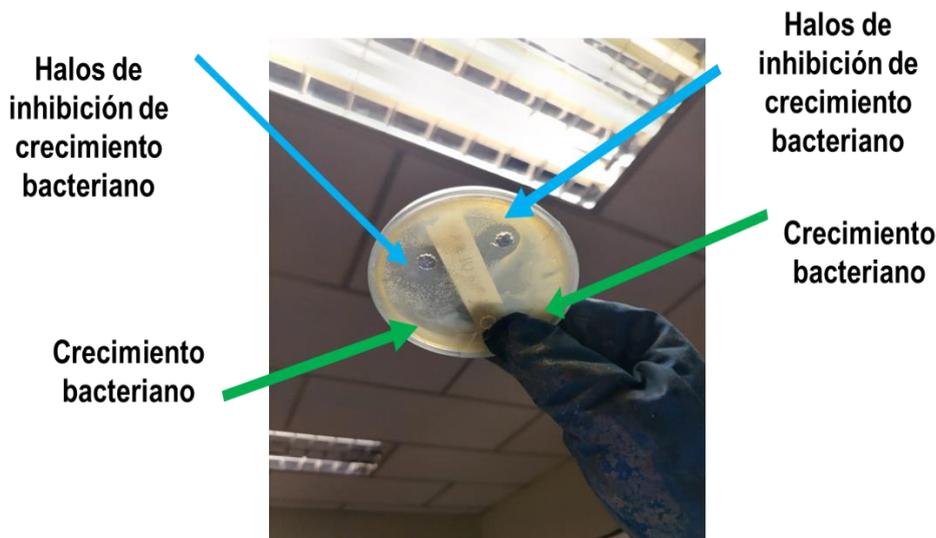
Tabla 4.2. Actividad antimicrobiana de extractos de propóleos a diferentes concentraciones sobre *E. coli*.

Concentración (1g/10 mL) (μ L)	*Halo Inhibición (mm)	**RIC
350	22 ^b	2,5
450	27 ^b	6,5
550	32 ^a	10,5

Nota: Mediana con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$) *Halos de inhibición Rangos de susceptibilidad: ≤ 15 (resistente) 16-20 (intermedia) ≥ 21 (susceptible). **Rango intercuartílico (RIC) se obtiene de la diferencia entre el Q3 y el Q1 de cada concentración en esta variable.

Se evidencia que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, a medida que se incrementa la concentración de los extractos el valor del halo de inhibición es mayor. Sin embargo, según el rango establecido de susceptibilidad las tres concentraciones evidenciaron que *E. coli* es susceptible a los extractos ensayados. Se observa en la Figura 4.1, la formación de halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*. en la caja de Petri que contiene propóleo como antimicrobiano.

Figura 4.1. Formación de halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*.



Nota: Se observa halos de inhibición *E. coli*

Estos resultados son comparables con los publicados por Rodríguez *et al.*, (2020); Belwal *et al.*, (2018); Hernández *et al.*, (2017); Vargas-Sánchez *et al.*, (2014a), quienes demostraron que los extractos de propóleo presentan excelente actividad antimicrobiana para un grupo amplio de bacterias gram positivo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*; y gram negativo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*. Sin embargo, Pobiega *et al.*, (2019); Vargas-Sánchez *et al.* (2014b) informan que la efectividad de los extractos de propóleo como antimicrobiano está vinculada a la composición química y el método de extracción aplicado.

Los mecanismos antimicrobianos que han sido propuestos son inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos de las funciones de la membrana citoplasmática, del metabolismo energético, y atenuación de la patogenicidad (Akca *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2015), los cuales están íntimamente vinculado con el contenido de polifenoles, específicamente los flavonoides (Rodríguez *et al.*, 2020; Luján *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha demostrado que compuestos fenólicos obtenidos de los extractos de propóleo, han inhibido eficientemente el crecimiento de hongos patógenos en el campo agropecuario tales como *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Microsporium canis* entre otros (Pobiega *et al.*, 2019).

4.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE *Staphylococcus aureus*

La Tabla 4.3, muestra la susceptibilidad de *S. aureus* a diferentes concentraciones de extractos de propóleo, lo cual se determinó aplicando el método de Bauer *et al* (1966), cuyos resultados indican el diámetro del halo formado expresado (mm).

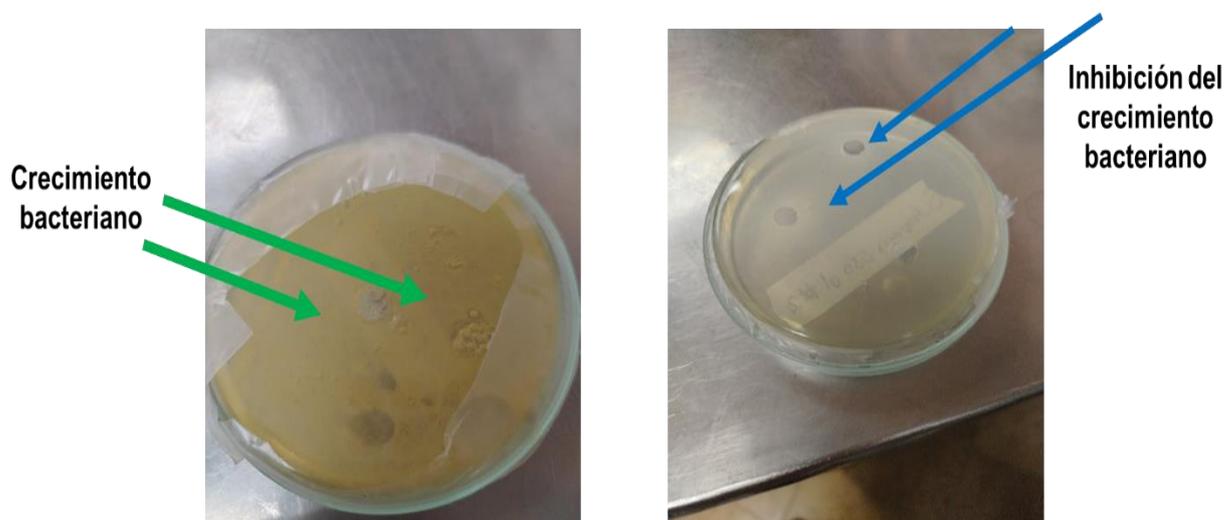
Tabla 4.3. Actividad antimicrobiana de extractos de propóleos a diferentes concentraciones sobre *S. aureus*.

Concentración (1g/10mL) (μL)	*Halo Inhibición (mm)	RANGO
350	42 ^b	2,5
450	50 ^a	6,5
550**	-	-

Nota: La mediana con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$) *Halos de inhibición Rangos de susceptibilidad: ≤ 15 (resistente) 16-20 (intermedia) ≥ 21 (susceptible). **Rango intercuartílico (RIC) se obtiene de la diferencia entre el Q3 y el Q1 de cada concentración en esta variable. **No se evidenció crecimiento de la bacteria investigada a la concentración ensayada.

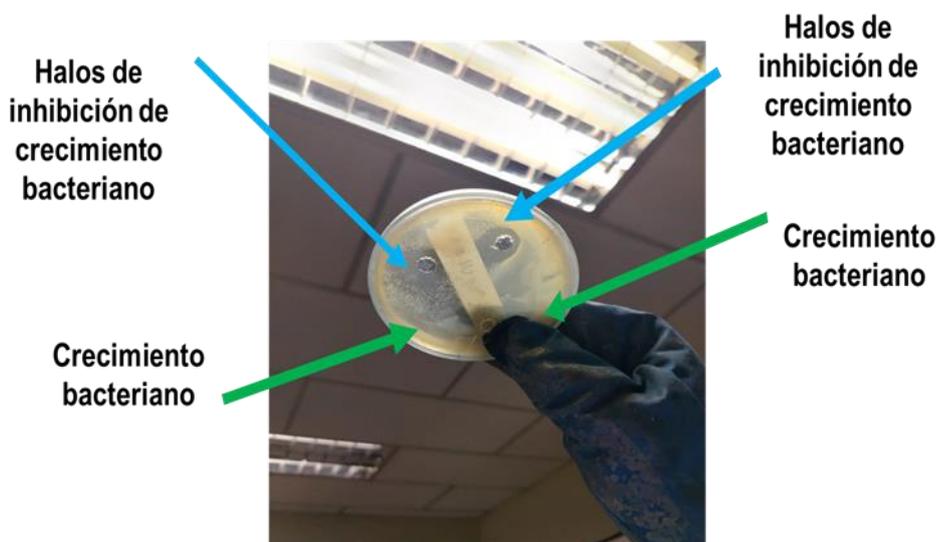
Se evidencia que existe diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, el valor del halo de inhibición 42 mm a 350 μL, es menor al exhibido a 450 μL, 50 mm. Aplicando la metodología especificada la bacteria *S. aureus* presenta susceptibilidad al rango de concentraciones ensayadas de extractos de propóleo. Se destaca, que no se observa crecimiento bacteriano a la mayor concentración ensayada 550 μL al compararla con el control, Figura 4.2.

Figura 4.2. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* a 550 μL en comparación con el tratamiento sin aplicación de propóleo.



Así mismo, se observa la formación de halos de inhibición del crecimiento de la bacteria *S. aureus* propóleo a concentraciones menores, Figura, 4.3

Figura 4.3. Formación de halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus*



Nota: Halos de inhibición *S. aureus*

La alta efectividad bactericida para la inhibición de *S. aureus* de los extractos de propóleos obtenidos en el presente estudio, sugieren, que los flavonoides presentes son: pinocembrina, acacetina, éster fenílico del ácido cafeico, quercetina kaempferol, pinobanskina, los cuales se han descrito como los principios activos para el control *in vitro* de esta bacteria (Rodríguez *et al.*, 2020; Vargas-Sánchez *et al.*, 2014a; Velázquez *et. al.*, 2007)

Se ha demostrado que el mecanismo de acción del propóleo como agente antibacteriano es realizado por los compuestos fenólicos, los cuales actúan como alteradores del potencial de membrana citoplasmática, por lo tanto, la bacteria pierde la capacidad de sintetizar ATP, inhibiendo su motilidad e impidiendo el desarrollo de la infección y la patogénesis, esta actividad antimicrobiana se le atribuye principalmente a los compuestos tales como: pinocembrina, quercetina naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, pinobanskina y a los compuestos cinámicos (Rodríguez *et al.*, 2020; Pobiega *et al.*, 2019; Vargas-Sánchez *et al.*, 2014b).

Los resultados del presente trabajo confirman la alta sensibilidad de los extractos de propóleo sobre las bacterias investigadas, sin embargo, la efectividad en términos cuantitativos, se observa una mayor actividad antimicrobiana en el control del *S. aureus* (gram positiva (GP)) en comparación con *E. coli* (gram negativa (GN)), lo cual, probablemente, es debido a que las bacterias GN presenta una membrana externa compleja con dos bicapas lipídicas que actúan como barreras físicas entre los microorganismos y el medio que los rodea, lo que evita las interacciones de la célula bacteriana con sustancias dañinas, mientras que las bacterias GP presentan sólo una membrana relativamente permeable, lo que las hace más susceptibles a las interacciones con el medio y a la exposición de antimicrobianos (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2020; Probst *et al.*, 2011).

4.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, A DIFERENTES HORAS 24, 48 Y 72 HORAS

El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones ensayadas (350 μL , 450 μL y 550 μL) al evaluar los halos de inhibición a las 24 y 48 horas. Sin embargo, tomando en consideración la curva de crecimiento de las bacterias investigadas cuyo pico máximo exponencial de crecimiento se encuentra en un rango de 18 a 22 horas y en consideración al método descrito por Bauer *et al.*, (1966) aplicado en el presente estudio, que indica, si el valor del halo de inhibición a las 24 h es mayor o igual a 21 mm, se considera que las bacterias son susceptibles, por lo tanto, no es necesario evaluar posterior a las 24 horas después de la siembra.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La composición química (fitoquímicos) del extracto del propóleo presentó excelente contenido de compuestos polifenólicos y flavonoides totales, a los cuales se le ha descrito propiedades antimicrobianas y antioxidantes, respectivamente.

Se evidenció la excelente actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos a las diferentes concentraciones ensayadas, en el control del desarrollo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias patogénicas de gran importancia en la salud animal.

La respuesta antimicrobiana del propóleo fue mayor en *S. aureus* en comparación con la exhibida para *E. coli*.

La presente investigación constituye un aporte a la actual solicitud de la Organización Mundial de la Salud en la búsqueda de compuestos nuevos de origen natural (fitofármacos), que contribuyan a contrarrestar la resistencia de microorganismos patógenos. Adicionalmente, el propóleo presenta alta actividad biológica, por lo tanto, este producto presenta propiedades nutraceuticas y antimicrobiana, surgiendo como alternativa terapéutica en la medicina veterinaria, fortaleciendo la salud pública.

5.1. RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos en otras bacterias y hongos patógenos de interés en la medicina veterinaria.

Caracterizar los compuestos bioactivos presentes en los extractos de propóleo para identificar cuales presentan actividad antimicrobiana y/o antioxidante.

Evaluar las propiedades antimicrobianas de extractos provenientes de especies arbóreas ampliamente diseminadas en la provincia de Manabí, previa caracterización química.

BIBLIOGRAFÍA

- Agropedia. (2022). *Propóleo: el tesoro de las abejas*. Agrotendencia.tv. <https://agrotendencia.tv/micros/propoleo-el-tesoro-de-las-abejas-%E2%94%82agro-en-2-minutos/>.
- Akca, A., Akca, G., Toksoy, F., Macit, E., Pıkdöken, L., & Özgen, I. (2016). The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3627463>.
- Al, I., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2018) Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines (Basel)* 3;5(1):2. <https://doi.org/10.3390/medicines5010002->
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., Da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., Falcão, S. I., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., y Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1–49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1. <https://doi.org/10.20450/mjccce.2016.864>
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (4):493-496. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5325707/>.
- Belwal, T., Ezzat, S., Rastrelli, L., Bhatt, I., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H., Orhan, I., Patra, J., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez, L., Nabavi, S., Nabavi, S., y Atanasov, A. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Chan, C., Gan, R., y Corke, H. (2016). The phenolic composition and antioxidant capacity of soluble and bound extracts in selected dietary spices and medicinal herbs. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(3), 565–573. <https://www.researchgate.net/publication/290437654>.
- Hernández, M., Abraham, M., Cerón, A., Gutiérrez, A., Gutiérrez, D. y Ávila, F. (2017). Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante.

- Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 55. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume2/3/10/99>.
- Huang, S., Zhang, C., Wang, K., Li, G., y Hu, F. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 26;19(12):19610-32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25432012/>
- Isidorov VA, Szczepaniak L, Bakier S. (2014). Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry*, 142: 101–106 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.032>.
- Lagouri, V., Prasianaki, D., y Krystalli, F. (2013). Antioxidant Properties and Phenoli Composition of Greek Propolis Extracts. *International Journal of Food Properties* 17, 511-522. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654561>.
- Laskar, R., Sk, I., Roy, N., y Begum, N. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.068>
- Laurencio, M., Arteaga, F., Rondón, A., Ormaza, J., Pinto, J., Pazmiño, D., Macías, M. (2017). Potencial probiótico *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes de la vagina de vacas lecheras. *Pastos y Forrajes*, 40(3): 206-215. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942017000300006.
- Martínez, M.; Sardiña, G.; Rondón, A., Pérez, A., y Pérez, Y. (2023). Composición fitoquímica y propiedades antibacterianas de *Ricinus communis* L. *Pastos y Forrajes*. 46. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v46/2078-8452-pyf-46-e13>.
- McDougall, G. (2016). Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76 (02): 163–171. 10.1017/s0029665116000835.
- Moncayo, M., Moreno, A., Galván, G., Reye, J., & Carrillo, M. (2018). Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods. *Nova scientia*, 10(20), 397-412. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1392>.
- Moredo, F., Larsen, A., y Stanchi, N. (2019). ETEC. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria Volumen: Bacteriología (131-141). Universidad Nacional de la Plata EduLP, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/74878>.
- Moredo, F., y Carriquiriborde, M. (2019). Mecanismos de patogenicidad bacterianos. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria Volumen: Bacteriología (6-29). Universidad Nacional de la Plata EduLP, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/74878>.
- Noriega, V. (2014). *El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica*. [Tesis de Pregrado, Universidad de Catabria]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/5580>.

- Organización Mundial de la Salud. (2024). La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. Sitio web de la Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/detail/04-04-2024-who-updates-list-of-world-s-most-dangerous-antibiotic-resistant-bacteria>.
- Pasupuleti, V., Sammugam, L., Ramesh, N., y Gan, S. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., & Gniewosz, M. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology/Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5386–5395. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>
- Probst, I., Sforcin, J., Vlm, R., Fernandes, A., y Júnior, A. (2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *the Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(2), 159–167. <https://doi.org/10.1590/s1678-91992011000200006>
- Rodríguez, B., Martínez, M., Carrillo, J., y Sánchez, T. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, 1–30. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Salamanca-Grosso, G. (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. Editorial Universidad del Tolima. <http://repository.ut.edu.co/handle/001/3130>
- Samara, N., Benitez, N., y Cabezas, F. (2011). Actividad antibacterial y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*. <https://doaj.org/article/62157315941e4b50bb828b57fcd2381c>
- Shixia, D., Xiushi, Y., Lei, Z., Fengxiang Z., Zhaohua H., Peng, X. (2020) Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products* 149, 112350. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112350>.
- Singleton V, Orthofer R., y Lamuela, R. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology* 299, 152-178. www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687999990171.
- Stanchi, N. O. (2019). Estafilococos. En Moredo, F. A., Larsen, A. E. & Stanchi, N. O. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria Volumen:

Bacteriología (142-154). Universidad Nacional de la Plata Edulp, Argentina.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/74878>.

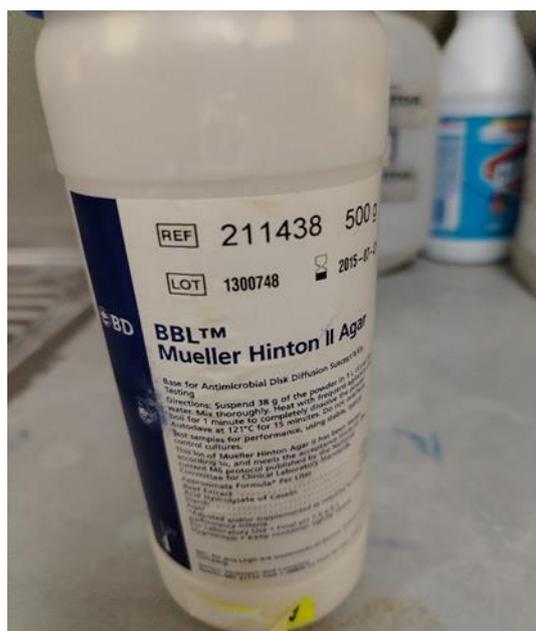
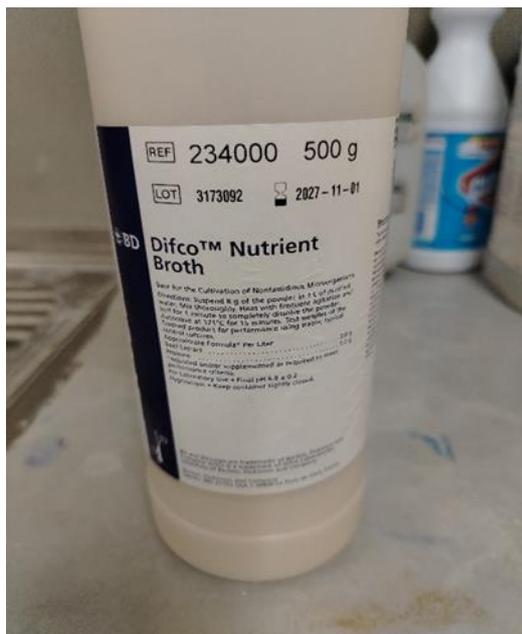
- Vargas-Sánchez, R., Torrescano, G., Acedo, E., Carvajal, E., González, A., Vallejo, B., Torres, M. J., y Sánchez, A. (2014a). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food Science*, 79(8).
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12533>
- Vargas-Sánchez, R., Torrescano, G., Mendoza, A., Vallejo, B., Acedo, E., Sánchez, J., Peñabal, M., y Sánchez, A. (2014b). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotecnia*, 16(1), 32.
<https://doi.org/10.18633/bt.v16i1.31>
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Ángulo, A., Domínguez, Z., Robles, R., Robles, R., Lugo, E., Goycoolea, F., Velázquez, E., Astiazaran, H., y Hernández, J. (2007). Antibacterial and free radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1747-1756.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x>.
- Wang, K., Ping, S., Huang, S., Hu, L., Xuan, H., Zhang, C., y Hu, F. (2013). Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from Chinese propolis (poplar type). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-11.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401705/>.
- Woisky R, y Salatino A (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*. 37, 99-105.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.1998.11100961>.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., y Ren, L. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-49. doi:
<https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>.

ANEXOS

ANEXO 1. PROCESAMIENTO DEL PROPÓLEO



ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVOS



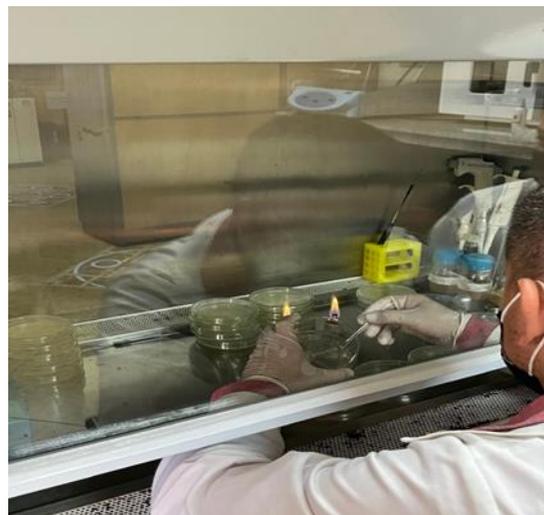
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS



ANEXO 4. ACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS



ANEXO 5. SIEMBRA DE BACTERIAS Y APLICACIÓN DEL PROPÓLEO



ANEXO 6. INCUBACIÓN DE LAS BACTERIAS A 35°C POR 24 HORAS.



ANEXO 7. REGLA MILIMITRADA PARA LA MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN



ANEXO 8. Actividad antimicrobiana de extractos de propóleo a diferentes concentraciones sobre *E. coli* a las 24 horas posterior a la inoculación

VARIABLE	CONC	N	MEDIAS	DE	MEDIANA	H	P-VALOR
<i>HALO (24 H)</i>	350	4	22	0	22	10	0,0002
<i>HALO (24 H)</i>	450	4	27	1,15	27		
<i>HALO (24 H)</i>	550	4	32,5	1	32		

ANEXO 9. Actividad antimicrobiana de extractos de propóleo a diferentes concentraciones sobre *S. aureus* a las 24 horas posterior a la inoculación

VARIABLE	CONC	N	MEDIAS	DE	MEDIANA	H	P-VALOR
<i>HALO (24 H)</i>	350	4	41	2	42	5	0,0286
<i>HALO (24 H)</i>	450	4	49,5	1	50		